

Л.Л. ПОПКОВА, А.В. КРИЖКО

Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського,
пр. Вернадського, 4, м. Сімферополь, 95007, АР Крим

**СПОСОБИ РОЗМНОЖЕННЯ IN VITRO РІДКІСНОГО
ЕНДЕМІЧНОГО КРИМСЬКОГО ВИДУ *CRATAEGUS POJARKOVAE*
KOSSYCH**

Ключові слова: глід Пояркової, розмноження, in vitro

Key words: hawthorn *Pojarkovae*, propagation, in vitro

L. POPKOVA, A. KRYZHKO

**THE WAYS OF PROPAGATION IN VITRO RARE CRIMEAN ENDEMIC
SPECIES *CRATAEGUS POJARKOVAE* KOSSYCH**

National Taurida V. Vernadsky University
4 Vernadskogo av., Simpheropol, 95007, AR Crimea

The various methods of reproduction in vitro *Crataegus pojarkovae* were the object of the researches. In consequence of investigations it was revealed the optimal nutrient medium, conditions of the seeds and buds sterilization. It was investigated the morphogenetic potencies of various callus types. Viable seedlings of *Crataegus pojarkovae* were got in two months of cultivation. The development in vitro conditions were been cutting down in 7-8 times as compared with natural germination and formation of seedlings ex situ for 14-17 months. The experiments for obtaining the regenerate plants from callus are continued.

Збереження біотичної різноманітності – це пріоритетний напрямок охорони природи загалом, а найціннішою частиною будь-якої регіональної фіто-різноманітності є ендеміки. *Crataegus pojarkovae* Kossyach є одним з ендеміків Криму (Карадаг), уключений до “Європейського Червоного списку тварин і рослин, що знаходяться під загрозою зникнення” (1991) і “Червоної книги України” (1996). Цей вид глоду відрізняється невибагливістю до ґрунтів, значною посухостійкістю і великими (до 2,5-3 см в діаметрі) жовтими плодами [2, 8]. Однак відновлення популяції *C. pojarkovae* вкрай незадовільне. Природними причинами, що лімітують розвиток і відновлення рослин, є нерегулярне плодоношення, низька схожість насіння і тривалий період його проростання (280-400 діб), знищення значної частини врожаю плодів гризунами [6]. Тому метою цієї роботи було вивчення різних способів розмноження глоду Пояркової в умовах in vitro для збереження рідкісного виду з наступною репатріацією в природні фітоценози.

Матеріали та методика

Матеріалом для проведення досліджень були зародки з насіння та бруньки глоду Пояркової (2000-2003 рр.). З метою одержання асептичних експлантів проводили ступінчасту стерилізацію зародків 70%-ним етанолом (1-2 хв) і потім 0,8%-ним AgNO₃ (1,5-2 хв) чи 50%-ним розчином брадофену (5-7 хв) з наступним триразовим промиванням у стерильній дистильованій воді. Кіль-

кість асептичних експлантів при цьому становила 65-90% для зародків та 95% для бруньок. Стерильні експланти поміщали на агаризовані живильні середовища: MS, 1/2 MS, Knudson. Експланти культивували у фітолюміностації, де підтримували температуру 22-25⁰С, відносну вологість повітря 60-70% і освітленість 1,5-2 клк. У ході досліджень використовували загальноприйняті в біотехнології методи [1, 3, 4].

Результати досліджень

Основним способом розмноження глодів у природних популяціях є насінневий. Насіння глоду має тверду оболонку і важко проростає. У літературі є вказівки на необхідність спеціальної передпосівної обробки насіння сірчаною кислотою для одержання сходів у першу весну. Передбачається проводити стратифікацію протягом шести або чотирьох місяців залежно від розмірів насіння з наступним посівом у відкритий ґрунт [5].

Зародки виділяли з насіння методом розколювання ендокарпію. Як показали дослідження, тільки 16-18%, іноді 20-22% насінин середньої проби і 47-74% елітних насінин (0,5-0,7 см завширшки) мають нормально сформований зародок. Дуже часто в середніх насінин зародок або відсутній (49-65%), або недорозвинений (23-28%). Аналіз морфометричних показників насіння *S. pojarkovae* (довжини і ширини насінин) показав, що найбільша кількість зародків знаходиться в насінні завширшки не менше ніж 0,5 см [7].

Найперспективнішим напрямком підвищення схожості насіння і одержання життєздатних рослин є застосування методів біотехнології, зокрема, культивування ізольованих зародків або ембріокультури *in vitro*. Використання ембріокультури дозволяє в умовах *in vitro* одержувати життєздатні рослини навіть з недорозвинених та аномальних насінин [3, 4].

Перед уведенням в умови *in vitro*, насіння *S. pojarkovae* піддавали впливу низьких позитивних температур і препарату неоселен, а виділені зародки – холодовій стратифікації й обробці різними концентраціями (10, 25 і 50 мг/л) водних розчинів гібереліну (GA). Як видно з табл. 1, майже всі варіанти передобробки насіння істотно впливали на розвиток зародків. При цьому позеленіння сім'ядоль у контролі відзначено на 33 добу, а в експериментальних варіантах на 5-7 добу.

Оптимальним варіантом передобробки зародків, виділених з насінин, була їх безпосередня холодова стратифікація за температури 0...+4⁰С протягом 3-5 діб. У цьому варіанті в разі розміщення культурального посуду з ізольованими зародками на освітлені стелажі через 5 діб спостерігали позеленіння сім'ядоль. Надалі тільки з зародків із зеленими чи фрагментарно позеленілими сім'ядолями були отримані повноцінні сіянці. Результати проведених експериментів погоджуються з літературними даними про те, що зародки плодкових культур (черешні, персика, груші) нормально розвиваються і формують повноцінні рослини під впливом низьких позитивних температур від 0⁰С до 5⁰С [7].

Оскільки виділені зародки *S. pojarkovae* є диференційованими, їх успішний розвиток відбувався на досить простих живильних середовищах. З трьох живильних середовищ MS, 1/2 MS, Knudson, кращим для розвитку проростків і найпростішим за складом було живильне середовище Knudson. Через 5-7 діб після введення в умови *in vitro* в зародків з усіма варіантами передобробки на-

сіння спостерігалось позеленіння сім'ядоль і починався морфогенез. У контролі, за умов *in vitro* зародків із сухих насінин, позеленіння сім'ядоль у 85,7% зародків відзначалося на 33 день. На 7-10 добу після позеленіння сім'ядоль у проростків починали розвиватися перші справжні листки й спостерігався ріст корінця. На цьому етапі розвитку проростки глоду Пояркової виявилися досить вимогливими до умов освітлення. Тільки в проростків на стелажах із освітленістю не менш 2 клк спостерігали появу темно-червоного гіпокотилу і розвиток корінця. Вимогливість до освітлення проростків погоджується з біологічними особливостями виду – *C. pojarkovae* є геліофітом, який росте на світлих галявинах чи відкритих просторах [2, 8].

Таблиця 1.

Вплив різних способів попередньої обробки насіння глоду Пояркової на розвиток зародків

Спосіб обробки насіння	Час позеленіння сім'ядоль, діб	Кількість зародків, що розвиваються, %
Витримування в дистильованій воді 15-20 діб	6-7	42,1±3,2
Витримування в дистильованій воді 15-20 діб + холодова стратифікація виділених зародків за $t=0-4^{\circ}\text{C}$, 5-7 діб	5	50,8±4,9
Витримування у водному розчині препарату неоселен (концентрація Na_2Se_3 $5 \cdot 10^{-5}$ мг/л) 10-20 діб	6-7	76,4±5,7
Витримування в дистильованій воді 15-20 діб + обробка виділених зародків розчином GA (10, 25, 50 мг/л) протягом 10 годин	5-6	91,3±2,4
Контроль (сухе насіння)	33	85,7±7,5

Протягом наступних 7-10 діб відбувався активний ріст справжніх листків і кореня проростків. З моменту розгортання першої пари справжніх листків проростки переходили в стадію сіянців. У сіянців, що сформувалися, з'являлася друга пара справжніх листків, характерної для глоду Пояркової форми. Активний ріст і розвиток сіянців спостерігали в наступні 7-10 діб: відзначалося утворення двох-трьох міжвузлів із двома парами розгорнутих листів, а довжина кореня в 4-5 разів перевищувала загальну висоту пагону. На 30-35 добу культивування, після перенесення на свіже живильне середовище, з'являлися ще одна-дві пари листків, а сіянці мали три-чотири міжвузля і досягали висоти 3-3,5 см.

Вивчення особливостей розвитку проростків *C. pojarkovae* в умовах *in vitro* показало, що крім нормально розвинених проростків з розвиненими листками й сформованим коренем, близько 50% сіянців корінь не утворюють. Такі сіянці мали по дві пари нормально розвинених листків, однак на ранніх стадіях проростки не формували корінець. Для вивчення вкорінення та підбору оптимальних концентрацій ауксинів, сіянці без корінців переносили на живильне середовище Knudson, доповнене 0,5 мг/л індолил масляною кисло-

тою (ІВА). Сіянци, що мали нормально розвинений корінь, були готові для адаптації до умов *in vivo* і їх пересажували у стерильні ґрунтові субстрати з місць виростання глоду. З кожних 100 виділених і поміщених в умови *in vitro* зародків можна отримати 40-50 сіянців, з яких 50% мають розвинений корінець і дві пари справжніх листків.

У результаті експериментів встановлено, що тривалість розвитку проростків і формування сіянців в умовах *in vitro* пересічно становило 40-45 діб, а в контролі (без передобробки насіння) не перевищувало двох місяців. Порівняно з природним розвитком у відкритому ґрунті розплідника, де перші проростки з двома розгорнутими зеленими сім'ядолями були отримані через 16 місяців, а сіянці через 17-17,5 місяців, розвиток в умовах *in vitro* прискорювався у 7-8 разів.

Однак з метою пошуку додаткових шляхів розмноження ендемічного виду глоду, нами вивчені деякі аспекти одержання гетерогенного калусу з вегетативно-генеративних бруньок.

Ізольовані від покривних лусок бруньки після стерилізації переносили на живильні середовища, що різнилися концентраціями ауксинів (2,4D і ІАА – індолил оцетовою кислотою) і цитокінінів (6-ВАР). Як видно з табл. 2, первинне утворення калусу спостерігалось лише на середовищах MS-1 та MS-5.

Таблиця 2.

Вплив складу живильного середовища на процес калусоутворення

Варіанти живильного середовища MS	Первинне утворення калусу	Вторинне утворення калусу (експланти перенесені із середовища MS-1)
MS-1 (1мг/л 2,4D + 0,1мг/л 6-ВАР)	Активне утворення калусу	Активне утворення оводненої калусної маси жовто-зеленого кольору
MS-2 (1мг/л ІАА)	Некроз експлантів	–
MS-3 (4мг/л 2,4D + 2мг/л 6-ВАР)	Тривале збереження життєздатності експлантів	Калус жовтого кольору, приросту маси не відзначено
MS-4 (2мг/л 2,4D + 4мг/л 6-ВАР)	Тривале збереження життєздатності експлантів	Активне утворення оводненої калусної маси білуватого кольору
MS-5 (6мг/л ІАА + 8мг/л 6-ВАР)	Слабке утворення калусу	Калус жовтого кольору, приросту маси не відзначено
MS-6 (1 мг/л 6-ВАР)	Дослідження не проводили	Активне формування оводненої калусної маси світло-зеленого кольору з утворенням меристематичних зон

Через 30-40 діб первинний калус, що активно наростав на середовищі MS-1, пасажували на свіжі живильні середовища. При цьому, залежно від складу живильного середовища, калуси відрізнялися за структурою, а саме: компактністю, ступенем обводнення, кольором, формою клітин, наявністю

меристематичних зон. Найактивніше калусоутворення відзначене на середовищах MS-1, MS-4, MS-6. У міру старіння калусу на двох перших середовищах його колір змінювався на коричневий.

Цитологічні дослідження показали, що для калусу на середовищах MS-1 та MS-4 характерна наявність багатоядерних гігантських клітин і великих клітин з жировими включеннями. Калусні культури на середовищі MS-6 вирізнялися наявністю меристематичних зон зеленого кольору. Під час цитологічного дослідження цього калусу виявлені численні скупчення дрібних клітин з великими ядрами, а також великі й червоподібні клітини. Дрібні клітини вказують на формування меристематичних зон і надалі з них можливе одержання соматичних ембріоїдів чи регенерації пагонів. Експерименти з дослідження калусу й одержання регенерантів продовжуються.

Висновки

Таким чином, у результаті експериментів з вивчення різних способів розмноження *in vitro* глоду Пояркової, встановлені оптимальні умови передобробки зародків і живильні середовища для їх розвитку, а також для первинного калусоутворення, визначені морфогенетичні потенції калусу на різних середовищах. Отримані позитивні результати з розмноження *in vitro* відкривають перспективи збереження і культивування рідкісного кримського виду *Crataegus pojarkovae*.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бутенко Р.Г. Биология высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учебное пособие. – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.
2. Голубев В.Н. Биологическая флора Крыма. – Ялта, 1996. – 86 с.
3. Здруйковская-Рихтер А.И. Культура изолированных зародышей и генеративных органов как метод селекции плодовых растений // Тканевые и клеточные культуры в селекции растений. – М.: ВАСХНИЛ, 1979. – С. 57-70.
4. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наук. думка. – 1980. – 488 с.
5. Косых В.М. О прорастании крымских видов боярышников // Бюлл. Главн. бот. сада – 1972. – Вып. 84. – С. 80-82.
6. Летухова В.Ю. Современный ареал исчезающего вида боярышника Поярковой // Труды Никит. ботан. сада. – 2001. – Т. 120. – С. 73-79.
7. Попкова Л.Л., Крыжко А.В. Размножение редкого крымского эндемика *Crataegus pojarkovae* Kossyuh в условиях *in vitro* // Мат. конф. молодых ученых “Актуальные проблемы ботаники и экологии” – Одесса, 2003. – С. 143-145.
8. Червона книга України. Рослинний світ. /Ред. Ю.Р. Шеляг-Сосонко./ – К.: Українська енциклопедія, 1996. – 680 с.